

遊離および固定化 β -ガラクトシダーゼに 対する圧力の効果

川出恒久^{*}、榊原三樹男^{*}、鈴木公宏^{*}、野村哲士^{*}、功刀 滋^{**}

Effect of Pressure on Free and Immobilized β -Galactosidase

Tsunehisa KAWADE, Mikio SAKAKIBARA, Akihiko NOMURA, Kimihiro SUZUKI,
and Shigeru KUNUGI

(Received Feb. 28, 1991)

Effect of hydrostatic pressure on the reactions catalyzed by β -Galactosidase in either free soluble state or immobilized on polymer micro beads was investigated. Both the hydrolysis of lactose to glucose and galactose and the formation of oligomer such as Gal-Gal-Glc were investigated. Up to 150-200 MPa this enzyme showed only a small irreversible inactivation, as detected by the activity assay after incubation at elevated pressure and by the *in situ* fluorescence measurement under the elevated pressure. In either free and immobilized state, the hydrolytic reaction was accelerated. This indicates the negative activation volume of the nucleophilic attack of water on galactosyl-enzyme (covalent) complex. The oligomer formation by free enzyme was depressed by increasing pressure but slightly higher yield of oligomer was observed for the immobilized enzyme under high pressure.

1. はじめに

圧力は温度とともに重要な熱力学的示強変数であり、その生物・生化学反応に対する影響は早くから意識されていたが、実験的には必ずしもこれまで十分に考慮されていなかった。最近種々の側面から圧力にかかわる研究が再度盛んに取り上げられるようになっており、例えば高圧力を新しい食品の加工技術にしようとする大きな動きが発生している¹⁾。これらの、圧力の効果・効能は、酵素を含むタンパク質の形態あるいは生体膜との相互作用のあり方などが、高圧下と常圧下で大きく異なることによってもたらされるといえる。

酵素反応の一つの特徴は、その高い特異性や選択性など以外に、穏和な条件下でいわば省エネルギー的に反応を進行させるということもある。ところが、本来酵素にとって縁のなさそうな環境で

*生物化学工学科、**京都工芸繊維大学高分子学科

働かせることにより、異なった様相の触媒機能を発現できることが幾つかの例において明らかにされてきた。有機溶媒中などはその代表例であるが²⁾ここで取り上げる圧力もその一例である。すでに功刀らはこの観点から、二三のプロテアーゼによるペプチド合成反応を高圧下で行い、圧力を加えることによりジペプチドの収率が增加することを示した³⁾。

一方、酵素を利用する上においては、固定化酵素の使用が魅力的であり⁴⁾、固定化された酵素の反応に及ぼす圧力の影響という問題も明らかにされるべきであろう。不均一系での圧力効果を再現よく測定するのは、装置上の問題や標品のばらつきなどかなりの困難があることは容易に理解される。これまでに行われている数少ない研究例としては次のものがある。佐藤らは攪拌装置のついた加圧反応装置を使って多孔性ガラスビーズに固定化したインペルターゼなどの反応を詳細に測定し、遷移状態における極性の増加と水の取り込みに起因する大きな負の活性化体積を観測している⁵⁾。一方北野らは光学的観測を可能にする固定化酵素として、高分子ラテックスに共有結合させたものを用い、光学窓の付いた加圧反応器で速度解析を行っている⁶⁾。TLN についていえば、遊離の酵素における値よりもかなり絶対値の小さな体積変化が k_{cat} と K_m の両方について得られており、反応の進行に伴うタンパク質の構造変化が、担体に複数の点で共有結合されている固定化酵素の場合には起こりにくいためではないかと考察している。

いずれにしても、活性化体積や反応体積が負である酵素の反応には、固定化酵素でも高圧下での操作は反応速度を高める効果が考えられる。さらに複数の反応が可能でその体積パラメーターがかなり異なっている場合には、特定のものをクローズアップできることが考えられる。

ここでは、微生物性の β -ガラクトシダーゼ(ラクターゼ)を対象として固定化酵素系での圧力効果の研究をとりあげる。 β -ガラクトシダーゼはラクトースを加水分解する酵素であり、栄養上の改良、味覚の改良などに多く利用されており、その反応は中間生成物としての三、またはそれ以上のオリゴ糖(OS)を伴った多くの複雑な過程を含む逐次反応であることがわかっている⁷⁾。ラクトース加水分解の促進という点からは、できるだけオリゴ糖の生成を抑える観点があり、一方最近のオリゴ糖の有用性に対する評価の高まりからすれば、どのような条件でオリゴ糖が最も良くできるかという視点がある。本報では圧力というパラメーターを主軸に、 β -ガラクトシダーゼによる、加水分解反応、オリゴ糖生成反応の両者を検討した。

固定化酵素と本論文のテーマである β -ガラクトシダーゼの反応との関係では以下のような研究例がある。すなわち、OSの生成については、Betschartが吸着とグルタルアルデヒド架橋によりイオン交換樹脂Duoliteに固定化した*A. niger*のラクターゼを用いてオリゴ糖の生成を観察した⁸⁾。一方、Prenosilは同様の実験で固定化ラクターゼの方が僅かにオリゴ糖の生成が減少したと報告している⁹⁾。近年、オリゴ糖はビフィズス菌成長因子などとしてその重要性を増してきている。このことは酵素的ラクトース加水分解でのオリゴ糖の生成に興味を集中させるものになる。このような場合にはOS収率をできるだけ上げるような反応条件が必要となってくる。その反面ホエイやミルクの処理という観点からすれば加水分解が高い方が望ましい事になる。

2. 実験

2. 1. 試薬

各種 β -ガラクトシダーゼのうち、ビオラクタ は大和化成㈱より、スミラクト は住友化学工業㈱より、ラクターゼ F (アマノ) は天野製薬㈱より恵与されたものを使用した。

o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (以下 oNPG) は和光純薬より購入したものを使用し、乳糖 (ラクトース) はナカライテスク㈱より購入し、緩衝剤の 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, monohydrate (以下 Mes)、N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (以下 Hepes) は同仁化学研究所㈱より購入した。

固定化用担体として用いたフェノール系樹脂 Duolite A-7 及び S-761 は住友化学工業㈱より恵与されたものを、また、マイクロビーズ (VK-1001、VK-1002) は日本ゼオン㈱より恵与されたものを使用した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩はナカライテスク㈱より購入したものを使用し、その他の試薬は市販の特級品を使用した。

2. 2. 酵素の固定化

高圧下で固定化酵素の反応を行うには、担体の固定化法の選択と装置上の問題がある。装置については後述するが、担体にはかなりの制限がある。一般に酵素の固定化は三種に分類されるが、このうち包括法、架橋法では加圧による固相の収縮、目づまりなどが非常に大きいと予想されるので、高圧下での使用は事実上不可能である。このため担体結合法で、しかも担体が比較的硬いものを使う必要がある。これまでに研究、半実用化された固定化 β -ガラクトシダーゼの多くはこの担体結合法であるが、ここではその内の一つとして弱イオン交換樹脂とアクリルアミド系マイクロビーズを取り上げ化学結合法により固定化したものを対象とした予備的試験を行ったが、S-761、A-7 共に 50rpm での攪拌試験では $38\mu\text{m}$ 以下の粒径においてさえも溶液中に分散せずに沈殿してしまうため高圧下の反応には不向きなことがわかった。アクリルアミド骨格を有する親水性ゲル粒子 (マイクロビーズ) である VK-1001、1002 は共に 50rpm での攪拌試験において分散した。さらに反応初期に攪拌し溶液中に分散させると攪拌を続行しなくてもきわめて長時間にわたって分散状態を持続した。固定化による活性への影響を調べたところ 1002 に比べ 1001 は極端に低い活性しか示さないため、以降の加圧下での反応には VK-1002 を担体として使用することにした。

マイクロビーズへの固定化は水溶性カルボジイミド (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドクロリド) を用いたカップリング反応にて行った。

カップリング反応を行う前に、カルボキシル基の換算モル数を求めるために以下の実験を行った。1.5ml 容のポリプロピレン製チップに水とビーズの混合溶液を入れ卓上遠心機で 6 分間遠心した後、上澄液を除去し、質量を測定して wet 重量を求めた。その後チップを 1 昼夜凍結乾燥にかけてから、質量を測定して dry 重量を求めた。その結果 VK-1001 では wet 重量 1g あたり dry 重量 0.3221g という結果が VK-1002 では wet 重量 1g あたり dry 重量 0.1269g という結果が得られた。以後全ての実験において、カルボキシル基換算モル数を VK-1001 では、 $(\text{wet 重量}) \times 0.3211 \times (9.4 \times 10^{-4} \text{ (VK-1001 カルボン酸仕込量)})$ 、VK-1002 では $(\text{wet 重量}) \times 0.1269 \times (18.2 \times 10^{-4} \text{ (VK-1002 カルボン酸仕込量)})$ により求めた。

固定化操作は 50ml 容三角フラスコに適当量の wet 状態のマイクロビーズをとり 10 倍量 (使用したミク

ロビーズのカルボキシル基換算モル数の10倍)のEDCをくわえ、0.2% (W/V) の酵素溶液を加えて20℃で固定化を行った。その後遠沈にて固定化酵素を回収しpH6.0のMES緩衝液で数回洗浄した。wet重量を測定し、oNPG活性を測定した後、反応に用いた。

2. 3. 装置

加圧下で使用する装置としては以下の二種類のものを使用した。

- ・高圧反応試験カプセル (山本水圧機製 HYPREX-C7000-19-1) 汎用の高圧試験カプセルであり、均一系の反応への加圧はすべてこの装置で行った。加圧装置 (油圧ポンプ (PM-300Y)) で増圧装置に圧力をかけ、一次側から二次側へ10倍に増幅してカプセル内に伝える。サンプルは上部のプラグ部をはずして入れ、加圧処理後にバルブより除圧し、サンプルを取り出す。カプセルの保温はジャケット内に循環恒温槽を使って水を通すことにより行える。加圧処理は反応液を250 μ l容ポリプロピレン製のチップに分取し、高圧反応カプセル内におさめ、一定時間後に取り出し、反応を停止し分析に供した。

- ・光学窓付高圧装置 (光高圧機製) 高圧下での光学測定を行うための装置である。加圧は (圧媒のサンプルへの混入を防ぐ意味で) 上部のピストンを介して行い、溶液はセル中で加圧される。光学窓はサファイヤ製であり、蛍光、吸収測定のために三方に設けられている。装置の温度はカプセルに巡らされた流路に恒温媒体を通すことにより制御できる。圧力ポンプは同社製の増圧器付手動ポンプ (KP10-B) を使用した。

2. 4. 方法

・活性測定

- ・oNPG分解 基質にラクターゼを作用させo-ニトロフェニル (以下oNP) とガラクトースに分解し、生じたoNPを420nmで分光分析し活性を測定する。ラクターゼ活性は以下の条件で酵素1gがoNPGから1分間に1 μ MのoNPを遊離させる量を1単位 (U) とした。

試験管にpH6.0の50 mM Mes 緩衝液に溶解した0.4% (W/V) のoNPGをとり、37℃で数分間インキュベートし10 μ g/mlの濃度の酵素溶液を1ml加え37℃で10分間反応させ、0.1M Na_2CO_3 を2ml加えて反応を停止させた。これとは別に試験管に0.4% (W/V) のoNPGをとり、0.1M Na_2CO_3 を2ml加えて10 μ g/mlの濃度の酵素溶液を1ml加え37℃で10分間反応させたものを対照として420 nmにおける吸光度を紫外可視分光光度計で測定し、以下の式で活性を求めた。

$$1 \text{ 単位/g} = \text{吸光度} / 0.777 (\text{oNP } 1 \mu\text{M OD}) \times 10 \text{ min} \times \text{酵素量}$$

固定化酵素の活性測定は反応終了後、遠沈にて固定化酵素を除去する操作を加えた。

- ・ラクトース加水分解 pHを調整した50mM Mes 緩衝液に10%の濃度になるようにラクトースを溶解し、37℃で数分間インキュベートし75Uの酵素液を加え反応させ、時間ごとに100 μ lサンプリングし900 μ lの純水を加え煮沸処理して反応を停止させた。分析は移動相に純水を用いたHPLC (Shimadzu LC-6A) にて行い、GPCカラム (TOSOH TSK gel G-Oligo-PW \times 2本) にて反応物を分離し、示差屈折計 (Shimadzu RID-6A) にてオリゴ糖を同定し、ピーク面積から各糖の割合を求めた。固定化酵素の活性1Uに対してラクトース初濃度が0.13%となるように設定し、反応終了後、遠沈にて固定化酵素を除去した。

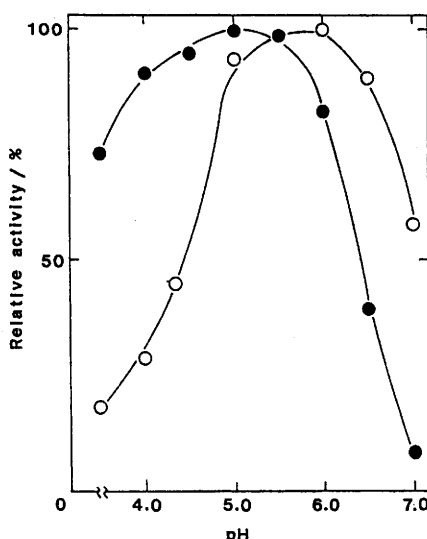


Fig. 1.

pH Dependence of oNPG hydrolytic activity of two lactases.
 ○, Biolacta (from *B. circulans*)
 ●, Lactase F (from *A. oryzae*)
 37°C, 0.05M acetate (3.5-5),
 0.05M Mes (5.5-6.5) or 0.05M
 Hepes (7).

3. 結果及び考察

3. 1. 可溶性酵素の反応

・ pH条件の選択

供給者からの提供情報によればバイオラクタ (*Batillus circulans*由来) は 6付近に至適pHを持ち *A. oryzae*由来であるスミラクとラクターゼFの至適pHは5以下である。バイオラクタとラクターゼFについてoNPGを基質として活性のpH依存性をしらべたのがFig. 1である。一般にラクトース分解の方がoNPG分解より若干高い至適pHを示すことが言われている。以下の測定は3つの酵素ともpH 6で行なうことにした。

・ 酵素の選択

Fig. 2-a, b はそれぞれバイオラクタ, スミラク, ラクターゼFによるオリゴ糖生成を経時的に示したものである。反応はラクトース初濃度10%(w/v)、温度37°C、pH 6.0で酵素濃度はそれぞれoNPG基質による測定で求めた活性値での、75Uの酵素量にて行った。これによると、バイオラクタとスミラクの間には顕著な差というものは認められず(バイオラクタの方がわずかにオリゴ糖生成能が高い)、ラクターゼFは前者に比べてオリゴ糖生成能が若干低いという結果が得られた。この結果をもとに、オリゴ糖生成能の高さに着目して以降の実験はバイオラクタを用いて行った。なお、オリゴ糖については四糖の生成も認められたが、1%以下の生成量であるためここでは省略する。

・ 加圧による変性

加圧下での反応の実施に先立ち、活性の不可逆的变化及び蛍光スペクトル変化をみた。

Table 1に見られるように高い圧力に長時間保持すると β -ガラクトシダーゼは不可逆的に失活していく。以下の実験では200MPaより低い圧力で操作を行うが、予想される反応時間(12時間)でも若干の失活があることに留意しなくてはならないであろう。この変性の様子は加圧処理後の蛍光強度(最大波長)の変化からも知ることができる。Fig. 3は加圧下での蛍光変化を示したものである。

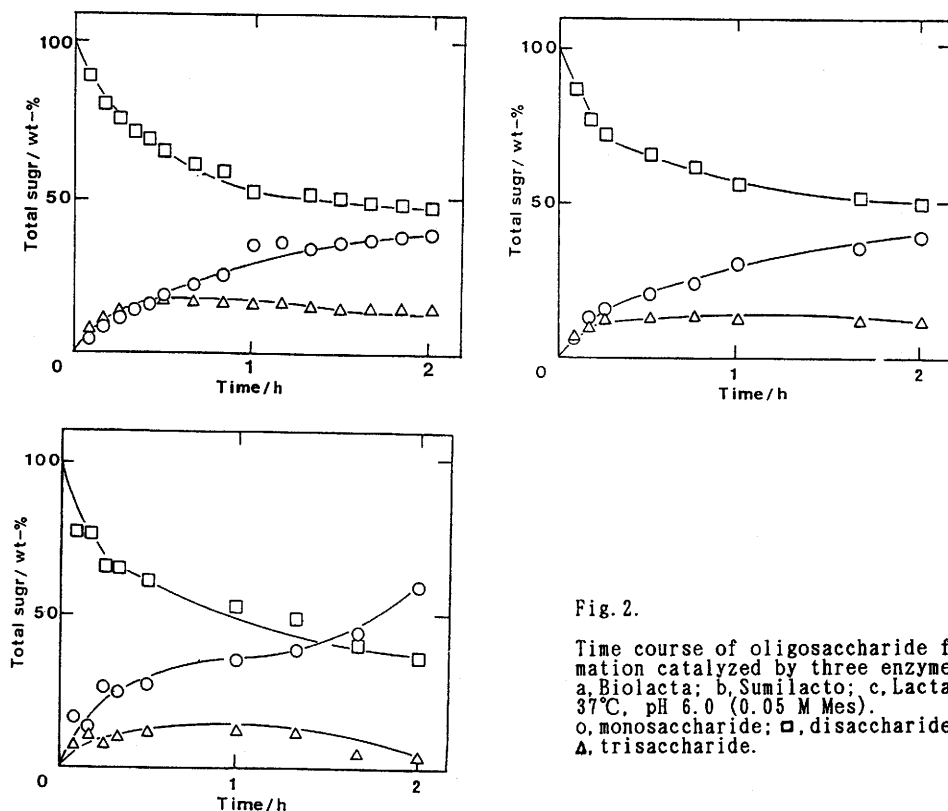


Fig. 2.

Time course of oligosaccharide formation catalyzed by three enzymes. a, Biolacta; b, Sumilacto; c, Lactase F. 37°C, pH 6.0 (0.05 M Mes). ○, monosaccharide; □, disaccharide; Δ, trisaccharide.

Table 1 Residual Activity and Fluorescence of β -galactosidase incubated under different conditions

conditions	activity* (%)	λ_{em} max (nm)	Fl. Int. (%)
4°C 0.1MPa 12h	96.6	335	100
4°C 150 MPa 12h	87.6	335	115
4°C 350 MPa 12h	57.3	336	122

加圧による体積減少から起きる濃度変化をトリプトファンの蛍光強度の変化により調べた(○)。また水の等温圧縮率からTaitの式によって計算される体積収縮にともなう濃度増加を----で示した。 β -ガラクトシダーゼと、対照してウシ血清アルブミン(BSA)とについて加圧による蛍光強度の変化を調べた結果がそれぞれ△, ▲と□, ■である。

0.1MPaより200MPaまで2分ごとに50MPa刻みで昇圧(中ぬき)し2分ごとに50MPa刻みで減圧(中ぬき)した時の最大蛍光強度(λ_{em} 350nm)の変化が示されている。BSAは変性によって蛍光強度が減少することが知られているが、この結果によっても昇圧によって濃度が上昇しているにも関わらず

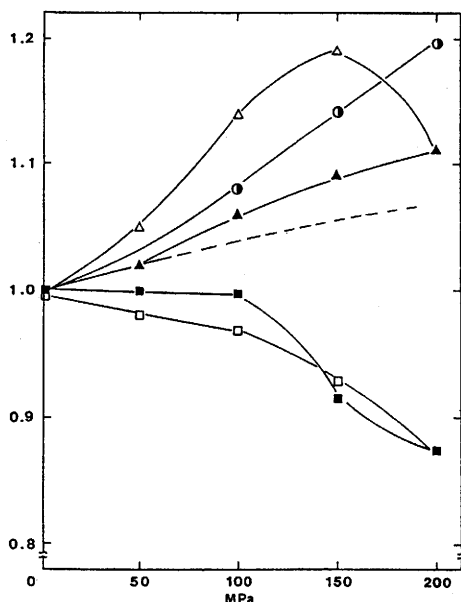


Fig. 3.

Pressure dependence of relative fluorescence intensity for bovine serum albumin and β -galactosidase. \circ , L-tryptophan; \square , BSA (1mg/ml); Δ , β -galactosidase. closed, increasing pressure; open, decreasing pressure.

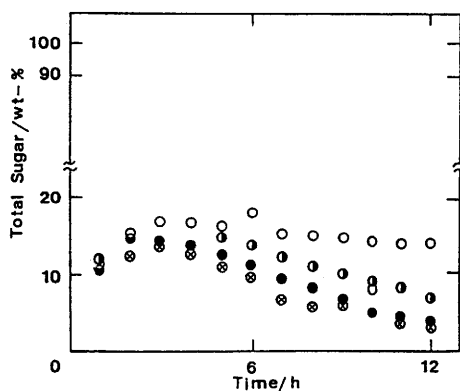
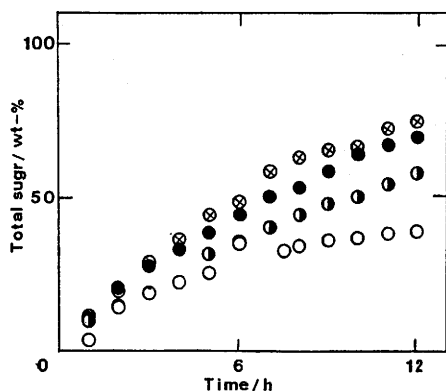
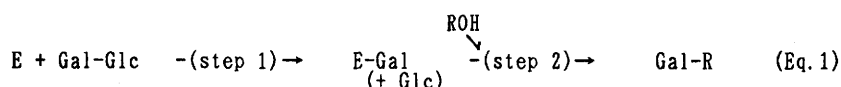


Fig. 4. Formation of monosaccharide (a) and disaccharide (b) by free enzyme at different pressure. \circ , 0.1MPa; \bullet , 50MPa; \bullet , 100MPa; \times , 150MPa.

蛍光強度が減少している。なお除圧によって蛍光強度が再上昇していることでこの範囲の圧力ではBSAの変性は可逆的に行われているが、若干の履歴が見られるのは、復性に時間がかかるためだと考えられる。これに対して、 β -ガラクトシダーゼでは蛍光強度は上昇するが濃度増加を考慮にいとするとその程度は余り大きくない。200MPaまで昇圧した後減圧する際の履歴がみられるが、これも変性に時間が必要であることを意味している。いずれにしろこの範囲（時間、圧力）の加圧処理において変性はほとんど可逆的なもので、酵素反応への影響を検討する際に問題のないことがわかる。

・加圧下での反応

Fig. 4-a, b はそれぞれの圧力 (0.1~150MPa) での単糖, 三糖の生成を示したものである。なお加圧下での反応は酵素量を遊離状態の1/5に落し、反応時間を6倍にとって行った。これはインターバルの短いサンプリングは圧力の影響を観察する上に好ましくなく、また装置の寿命も縮めるという理由によるものである。β-ガラクトシダーゼによるラクトース加水分解機構は*E. coli* 給源のラクターゼを用いてWallenfelsとMalhotraにより最初に発表され^{7-a)}、重要な段階はグルコースの遊離と同時に起こるガラクトシル-酵素複合体の形成であるとされ、一般的にはガラクトシル転移反応であるといえる (Eq. 1)^{7-b)}。これは酵素がβ-ガラクトシドのガラクトース部分から、水酸基を含む受容体へ転移することを示す。この受容体が水であるとガラクトースが形成され、活性部位から遊離する。しかし、溶媒中に存在する他の糖 (例えばラクトース) が受容体として作用し、新しい糖すなわちオリゴ糖が形成される^{7-c)}。



β-ガラクトシダーゼ反応への圧力の効果について考えれば、Eq. 1でのR-OHによる求核反応の圧力の依存性がR基によって異なるかという問題と、1及び2のステップで中間的に生成されるであろう四面型中間体の極性がモル体積変化としてどうあらわれるかという問題が主となる。ここでの結果では単糖の生成は圧力により加速され、三糖の生成は減少している。これにより単糖生成時の見かけの ΔV^\ddagger は負の値をとっており、三糖生成 (ガラクトシル転移反応) の見かけの ΔV^\ddagger (ガラクトシル酵素へのラクトースの結合過程のモル体積変化をも含む) は正の値をとっているのがわかる。ただし加圧下での三糖生成の低下はそのピーク値のみならず長時間経過後に顕著である。従ってガラクトシル酵素とラクトースとの反応が低下したことよりも、むしろ一旦生成した三糖が新たに酵素の基質となり再び二糖と単糖に分解される過程が速くなったことによる方が大きいと考えられる。再分解、再々結合、結合の組替えまで入れるとβ-ガラクトシダーゼの反応は複雑になる¹⁰⁾。三糖までの生成に限って議論しても三糖はGal-Gal-Glcである可能性とGal-Gal-Gal (再分解してできたGal-Galへのガラクトシル転移) である可能性が、また二糖はGal-GalかGal-GlcかGal-(6)-Glc (アロラクトース) である可能性がある。ここでは単糖 (GalまたはGlc) をも含めて糖のアイソマーの分離、同定を行っていないので、Gal-Gal-Glcの生成のみを想定すると、その生成量はガラクトシル酵素の加水分解反応、ガラクトシル転移反応と三糖の再分解とのバランスによって決定されるといえる。三糖と二糖の加水分解は本質的に同じ様な機構で起こっていると考えられ、Scheme 1の第一ステップ及び第二ステップ (ROH=H-OH) における活性複合体の極性増加による水和水の増加が負の ΔV^\ddagger の要因であると考えられる。このうち第一ステップはガラクトシル転移反応と共通しているので第二ステップの ΔV^\ddagger が主因であろう。同じくグリコシド結合を分解する酵素反応についてこれまで報告されている ΔV^\ddagger は-4 (デキストラナーゼ、インベルターゼ)⁹⁾、-28 (スイ臓アミラーゼ)¹⁰⁾、-22 (唾液アミラーゼ)¹¹⁾ ml/molといずれも負の値である。ラクトースのガラクトシル酵素への結合はイオン性相互作用を含んでおらず主に水素結合によっていると思われる。これまでの研究から水素結合の生成に伴う ΔV は負であると報告されているが、転移反応での正の

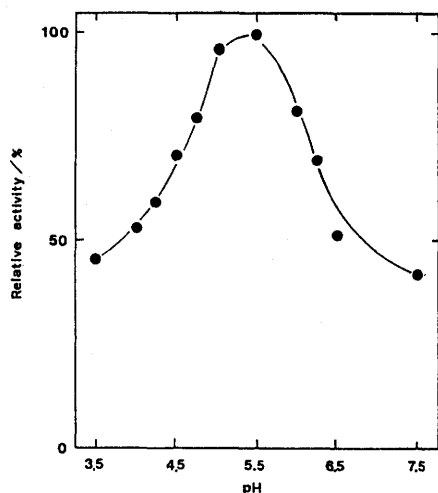


Fig. 5.
pH Dependence of oNPG hydrolytic activity of the enzyme immobilized on microbeads (VK-1002). 37°C. Buffers are as in Fig. 1.

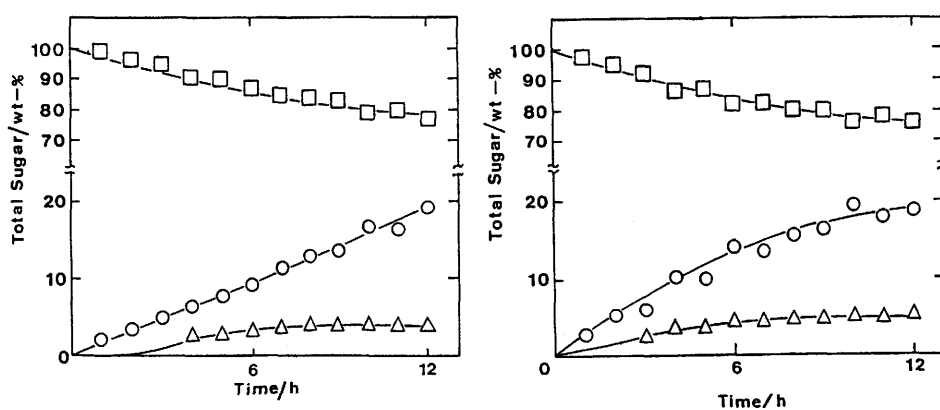


Fig. 6. Time course of oligosaccharide formation by the enzyme immobilized on microbeads at 37°C.
a, at 0.1 MPa; b, at 150 MPa.
○, monosaccharide; □, disaccharide; Δ, trisaccharide.

見かけの ΔV^\ddagger はこのラクトース結合の ΔV が正であることを示唆しているかもしれない。これは糖が遊離した溶液中で水分子と強く水素結合しているか、もしくはラクトース結合により酵素の高次構造に変化が生じているためと思われる。

3. 2. 固定化酵素の反応

・ pH依存性

VK-1002はイオン基 ($-COO^-$) があるので遊離状態の酵素反応に比べて至適pHが移動する可能性がある。そこでpH3.5~7.5の間で活性測定を行った (Fig. 5)。遊離状態の曲線 (Fig. 1) に比べ

て至適pHが酸性側に移行している事がわかる。固定化担体の解離基の影響については数多くの報告があるが、一般的には担体付近のプロトン濃度の違いからアニオン性担体では至適pHが高pH側へ移動しカチオン性担体では低pH側へと動くと考えられているが¹¹⁾、ここでの結果はそれとは逆である。しかしながら、実験は遊離酵素との比較からpH 6.0で行った。

・加圧下での反応

Fig. 6-a, bはそれぞれ0.1MPa, 150MPaでの固定化ラクターゼによるオリゴ糖生成を示したものである。加圧下での反応においては可溶系と同様に単糖の加速が見られる。これは可溶系と同じく二糖の加水分解の(見かけの) ΔV^\ddagger が負であり、反応速度が加圧により大きくなったことに起因しているものと思われる。三糖の生成についてはあまり差は見られないが初期だけを見ると加圧下の方が若干ではあるが増加しており、疑似定常レベルでも少し増加している。しかしながら圧力による結果よりも遊離酵素に替えて固定化酵素を使用することの方がより大きく三糖の生成に影響し、抑制する方向に働いている。

さらに反応系の水含量の影響など今後の検討されるべきであろう。

引用文献

- 1) a, 林 力丸編 "食品への高圧利用"、さんえい出版(1989): b, 林 力丸編 "加圧食品—研究と開発—"、さんえい出版(1990)
- 2) A.M.Klibanov, *Chemtech*, **16**, 354 (1986)
- 3) a, S.Kunugi, K.Tanabe, M.Fukuda, S.Makimoto, & Y.Taniguchi, *J.Chem.Soc., Chem.Comm.*, 1335 (1987): b, S.Kunugi, K.Tanabe, K.Yamashita, Y.Morikawa, T.Ito, T.Kondoh, K.Hirata, & A.Nomura, *Bull.Chem.Soc.Japan*, **62**, 514 (1989)
- 4) a, 千畑一郎編, "固定化酵素", 講談社(1975): b, K.Mosbach Ed., "Methods in Enzymology", Vol.44, "Immobilized Enzyme", Academic Press(1976): c, 福井三郎ほか編, "酵素工学", 東京化学同人(1981): d, 千畑一郎編, "固定化生体触媒", 講談社(1986)
- 5) M.Sato, S.Ozawa, & Y.Ogino, *J.Phys.Chem.*, **91**, 5775 (1987)
- 6) H.Kitano, & N.Ise, *Biotech. Bioeng.*, **31**, 507 (1988)
- 7) a, K.Wallenfels, & O.P.Malhotra, " β -Galactosidase," in "The Enzymes" (Ed. P.D.Boyer) Vol.4, 2nd ed.(Academic New York,1960): b, I.J.Jeon, & S.Bourgeois, *J.Mol.Biol.*, **69**, 307 (1972): c, K.Nishizawa, & Y.Hasimoto, in "The Carbohydrates"(Ed W.Pigman), Vol. II-A, p.241, (Academic Press, New York, 1970): d, M.Anderson, *Arch.Biochem.Biophys.*, **15**, 1994 (1952): e, J.H.Pazur, *J.Biol.Chem.*, **208**, 439 (1954): f, H.R.Roberts, & J.D.Pettinati, *Agric. Food Chem.*, **5**, 130 (1957)
- 8) H.Betschart, Diss. ETH No. 7360, Zurich, (1983)
- 9) J.E.Prenosil, E.Stuker, & J.R.Bourne, *Biotechnol.Bioeng.*, **30**, 1026 (1987)
- 10) R.E.Huber, G.Kurz, & K.Wallenfels, *Biochemistry*, **15**, 1994 (1976)
- 11) S.Kunugi, Y.Morikawa, M.Ishida, & Y.Nakamura, *Polymer J.*, **19**, 269 (1987)